

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *true eksperimental*, dengan menggunakan *post test only control group design*. Metode yang dipakai adalah dilusi tabung (*tube dilution test*) dan difusi cakram (*disk method*) untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Metode dilusi tabung untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) serta metode difusi cakram untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM).

#### **4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada Bulan Mei 2019, di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

#### **4.3 Populasi dan Sampel**

##### **4.3.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang yang dibuktikan dengan adanya surat keterangan bakteri dari Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

#### 4.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang yang dibuktikan dengan adanya surat keterangan bakteri dari Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang dan diambil dengan menggunakan teknik *Simple Random Sampling*.

#### 4.3.3 Estimasi Jumlah Pengulangan

Penelitian pada metode dilusi menggunakan 6 kelompok perlakuan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) dan 2 kelompok kontrol (kontrol bahan dan kontrol kuman) sehingga terdapat 8 kelompok. Sedangkan pada metode difusi menggunakan 6 kelompok perlakuan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) dan 1 kelompok kontrol (kontrol bahan) sehingga terdapat 7 kelompok. Berdasarkan rumus perhitungan jumlah sampel dengan pendekatan *Resource Equation*, berikut k adalah jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah pengulangan, maka:

Metode dilusi:

Minimal

$$n = \frac{10}{k} + 1$$

$$n = \frac{10}{8} + 1$$

$$n = 2,25 \approx 3$$

Maksimal

$$n = \frac{20}{k} + 1$$

$$n = \frac{20}{8} + 1$$

$$n = 3,5 \approx 4$$

Metode difusi:

Minimal

$$n = \frac{10}{k} + 1$$

$$n = \frac{10}{7} + 1$$

$$n = 2,42 \approx 3$$

Maksimal

$$n = \frac{20}{k} + 1$$

$$n = \frac{20}{7} + 1$$

$$n = 3,85 \approx 4$$

Dari perhitungan diatas, maka diperlukan minimal 3 kali pengulangan dan maksimal 4 kali pengulangan untuk masing-masing sampel pada metode dilusi dan metode difusi (Arifin & Zahiruddin, 2017).

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) dengan konsentrasi pada metode dilusi, yaitu 100%

(kontrol bahan); 12.5%; 6.25%; 3.12%; 1.56%; 0.78%; 0.39%; 0% (kontrol kuman) dan pada metode difusi, yaitu 100% (kontrol bahan); 25%; 12.5%; 6.25%; 3.12%; 1.56%; 0.78% (Lusida, et al., 2017).

#### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* yang dapat dilihat dari Kadar Hambat Minimal (KHM) dan jumlah koloni bakteri yang dapat dilihat dari Kadar Bunuh Minimal (KBM).

#### 4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Indikator Penilaian	Skala
<b>Variabel Bebas</b>					
1.	Ekstrak kelopak bunga rosella ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn.)	Ekstrak kelopak bunga rosella yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelopak bunga rosella dengan metode ekstraksi maserasi dengan larutan etanol 96% kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan filtrat dari ampas kemudian diuapkan dengan <i>rotatory evaporator</i> , sehingga dihasilkan ekstrak kelopak bunga rosella yang bebas dari pelarut etanol 96%.	Diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% lalu diuapkan menggunakan <i>rotatory evaporator</i> .	Konsentrasi pada metode dilusi: 1. 100% (kontrol bahan) 2. 12.5% 3. 6.25% 4. 3.12% 5. 1.56% 6. 0.78% 7. 0.39% 8. 0% (kontrol kuman)  Konsentrasi pada metode difusi: 1. 100% (kontrol bahan) 2. 25% 3. 12.5% 4. 6.25% 5. 3.12% 6. 1.56% 7. 0.78%	Ordinal

<b>Variabel Tergantung</b>					
2.	Pertumbuhan bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	Pertumbuhan bakteri yang dilihat dengan menghitung jumlah koloni bakteri pada media agar.	Penghitungan dengan <i>Colony Counter</i> .	Jumlah koloni pada media agar.	Rasio
3.	Kadar Hambat Minimal (KHM)	Kadar minimal ekstrak kelopak bunga rosella yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> yang ditandai dengan terdapatnya zona inhibisi pada difusi cakram.	Metode difusi cakram yang dilihat dari zona inhibisi disekitar cakram.	Diameter zona inhibisi di sekitar cakram pada metode difusi cakram.	Rasio
4.	Kadar Bunuh Minimal (KBM)	Kadar minimal ekstrak kelopak bunga rosella yang mampu membunuh bakteri, ditandai dengan penurunan 99,9% koloni bakteri pada media agar.	Penghitungan koloni bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> menggunakan <i>colony counter</i> yang dibandingkan dengan kontrol bakteri.	Jumlah koloni pada media agar <0,1%.	Rasio

#### 4.6 Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella

Tabel 4.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella

<b>Alat</b>	<b>Bahan</b>
Blender	Kelopak bunga rosella
Kain saring	Etanol 96%
Tabung ekstraktor	<i>Aquadest</i>
Labu destilasi	
Wadah tertutup	
Pendingin spiral	
<i>Water pump</i>	
<i>Evaporator</i>	
Neraca analitik	

#### 4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Media *Nutrient Broth* (NB)

Tabel 4.3 Alat dan Bahan Pembuatan Media *Nutrient Broth* (NB)

Alat	Bahan
Erlemeyer (gelas berskala)	<i>Nutrient Broth</i> (NB)
Tabung reaksi	<i>Aquadest</i>
Alumunium foil	

#### 4.6.3 Alat dan Bahan Pembuatan *Blood Agar Plate* (BAP)

Tabel 4.4 Alat dan Bahan Pembuatan *Blood Agar Plate* (BAP)

Alat	Bahan
Cawan petri	<i>Nutrient Agar</i> (NA)
Erlemeyer (gelas berskala)	<i>Aquadest</i>
<i>Hot plate stir</i>	Darah
Alumunium foil	

#### 4.6.4 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella

Tabel 4.5 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Kelopak Rosella

Alat	Bahan
Tabung reaksi steril	Pembenihan cair bakteri
Ose lengkung	Ekstrak kelopak bunga rosella
Lampu spirtus	<i>Nutrient Broth</i> (NB)
<i>Vortex</i>	<i>Blood Agar Plate</i> (BAP)
<i>Colony counter</i>	
Label	
Inkubator	
Laminair	

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Sterilisasi Alat

Prinsip sterilisasi dalam mikrobiologi adalah mematikan semua organisme yang ada pada suatu alat. Menurut (Suriantika, et al., 2013), sterilisasi alat dapat menggunakan cara oven dan autoklaf. Cara oven dilakukan dengan membungkus alat-alat yang akan disterilisasi seperti gelas ukur, gelas kimia, labu erlenmeyer, dan yang lain dengan kertas bekas yang kemudian dimasukkan ke dalam oven. Sedangkan, cara autoklaf dilakukan dengan memasukkan alat-alat yang akan

disterilisasi ke dalam wadah autoklaf, kemudian tutup rapat autoklaf dan nyalakan dengan suhu 121 °C minimal 15 menit.

#### **4.7.2 Pembuatan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella**

Berikut langkah-langkah dalam pembuatan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.)

1. Sebanyak 1 kilogram kelopak bunga rosella yang telah dicuci bersih dengan air dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam selama beberapa hari sampai kering.
2. Kelopak bunga rosella yang telah kering dibuat serbuk simplisia dengan cara dihaluskan dengan blender.
3. Serbuk simplisia kelopak bunga rosella sebanyak 500 gram diekstrak dengan menggunakan 2 liter etanol 96% dalam maserator selama  $\pm$  24 jam.
4. Hasil perendaman serbuk simplisia kelopak bunga rosella lalu disaring dengan kertas penyaring, kemudian hasil saringan dimasukkan dalam botol kaca.
5. Maserasi kembali residu kelopak bunga rosella sampai 3 kali dengan cara yang sama dan dilakukan pengadukan 1 kali dengan batang pengaduk kaca.
6. Filtrat yang dihasilkan ditampung menjadi satu lalu diuapkan agar terpisah dari pelarutnya dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40 °C. Hal ini dilakukan untuk menjaga agar senyawa metabolit sekunder tidak rusak oleh suhu yang terlalu tinggi sampai pelarut habis menguap sehingga didapatkan ekstrak kental kelopak bunga rosella.
7. Ekstrak kental kelopak bunga rosella lalu ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup sebelum digunakan untuk pengujian.

#### 4.7.3 Pembuatan Medium *Nutrient Broth* (NB)

Menurut (Fadriawan, 2018), cara membuat medium *Nutrient Broth* (NB) adalah sebagai berikut:

1. Timbang *Nutrient broth* sebanyak 0,65 gram, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer. Tambahkan *aquadest* sampai volume menjadi 50 ml dan diaduk hingga homogen.
2. Tutup erlenmeyer dengan kapas dan dilapisi dengan kasa, kemudian sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
3. Dinginkan, lalu amati bentuk dan warnanya.

#### 4.7.4 Pembuatan Medium *Blood Agar Plate* (BAP)

Menurut (Mudatsir, 2010), cara membuat medium *Blood Agar Plate* (BAP) adalah sebagai berikut:

1. Timbang *Blood Agar Base* (BAB) sebanyak 20 gram, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer. Tambahkan *aquadest* sampai volume mencapai 500 ml, lalu diaduk hingga merata.
2. Rebus larutan sampai homogen.
3. Larutan yang sudah direbus, kemudian di masukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit untuk disterilisasi.
4. Larutan yang telah disterilisasi, kemudian dicampur dengan darah sebanyak 35 ml dengan cara digoyangkan. Setelah itu, dimasukkan ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 1 mL.



#### 4.7.5 Pembiakan Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri dengan kepadatan  $10^6$  bakteri/mL. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* distandarisasi dengan menggunakan metode Mc. Farland 1, yaitu setara dengan kepadatan bakteri  $10^8$  bakteri/mL.

Berikut langkah-langkah dalam membuat suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* kepadatan  $10^6$  bakteri/ml:

1. Ambil 4-10 ose bakteri *Streptococcus pyogenes* dari media agar yang telah diinkubasi selama 24 jam, kemudian masukkan ke dalam tabung yang telah berisi *aquadest* dan homogenkan. Suspensi bakteri tersebut disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 1, sehingga akan menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan  $10^8$  bakteri/ml.
2. Ambil 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan kepadatan bakteri  $10^8$  bakteri/ml, kemudian masukkan ke dalam tabung yang telah diisi *aquadest* sebanyak 9 ml. Kepadatan bakteri *Streptococcus pyogenes* sekarang menjadi  $10^7$  bakteri/ml.
3. Ambil lagi 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan kepadatan bakteri  $10^7$  bakteri/ml tersebut, kemudian masukkan ke dalam tabung yang telah diisi *Nutrient Broth* (NB) sebanyak 9 ml. Kepadatan bakteri *Streptococcus pyogenes* sekarang menjadi  $10^6$  bakteri/ml.

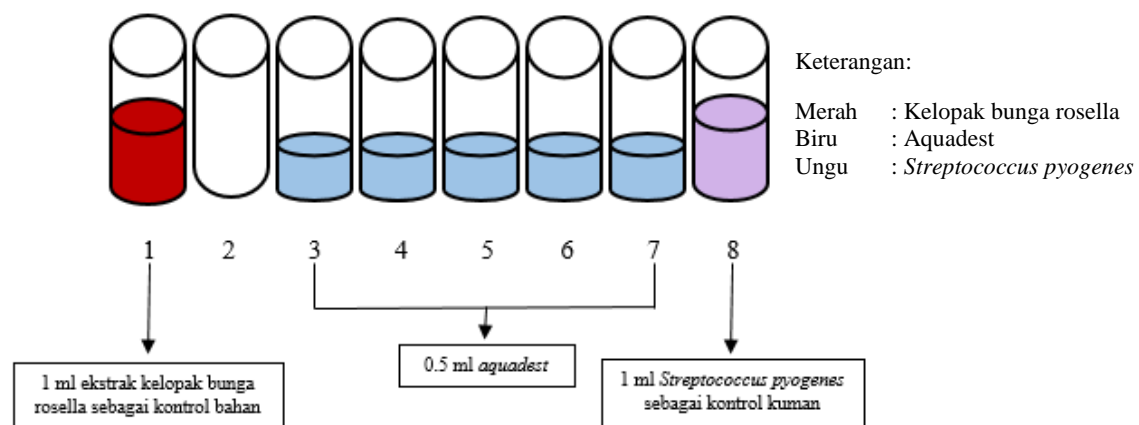
#### 4.7.6 Uji Kepekaan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Terhadap *Streptococcus pyogenes*

##### 4.7.6.1 Metode Dilusi Tabung

Uji kepekaan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) terhadap *Streptococcus pyogenes* dengan metode dilusi tabung berdasarkan penelitian (Lusida, et al., 2017), dapat digambarkan sebagai berikut:

Hari ke-1:

- Menyediakan 8 tabung steril; tabung 1, tabung 2, tabung 3, tabung 4, tabung 5, tabung 6, tabung 7, dan tabung 8. Masing-masing diberi perlakuan ekstrak kelopak bunga rosella 6 konsentrasi dan 2 tabung kontrol (kontrol bahan dan kontrol kuman).
- Memasukkan 0.5 ml *aquadest* pada tabung 3, 4, 5, 6, 7, dan 1 ml ekstrak kelopak bunga rosella pada tabung 1 serta 1 ml bakteri pada tabung 8.

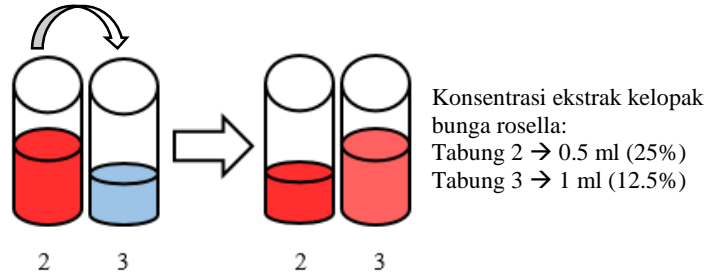


- Masukkan 0.5 ml (100%) ekstrak kelopak bunga rosella ke dalam *aquadest* 0.5 ml, campurkan merata dengan menggunakan vorteks (volume menjadi 1 ml, konsentrasi 50%), lalu ambil 0.5 ml (50%) ekstrak kelopak bunga rosella

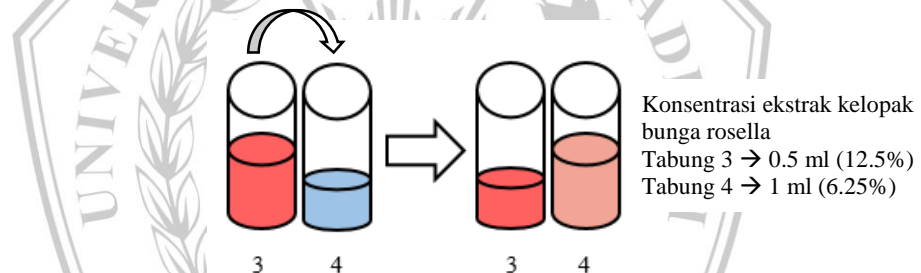
tersebut dan masukkan lagi ke dalam *aquadest* 0.5 ml, campurkan merata dengan menggunakan vorteks (volume menjadi 1 ml, konsentrasi 25%).

Masukkan volume 1 ml dengan konsentrasi 25% tersebut ke dalam tabung 2.

- d. Ambil 0.5 ml dari tabung 2 kemudian masukkan dalam tabung 3.



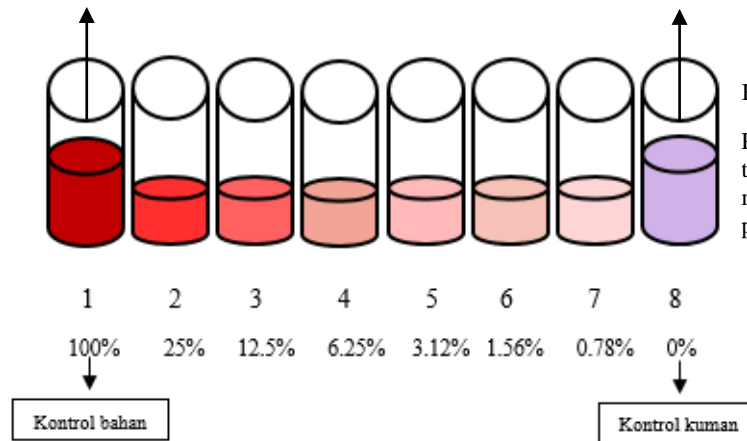
- e. Mencampur hingga rata *aquadest* dengan ekstrak kelopak bunga rosella pada tabung 3, kemudian pindahkan 0.5 ml ke dalam tabung 4.



- f. Melakukan hal yang sama terhadap tabung 4, 5, 6, dan 7.
- g. Pada tabung 7 setelah larutan tercampur rata dibuang 0.5 ml.
- h. Dari pengenceran diatas, maka volume masing-masing tabung 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 menjadi 0.5 ml dengan konsentrasi awal antimikroba dari masing-masing tabung adalah :

Ekstrak kelopak bunga rosella

*Streptococcus pyogenes*



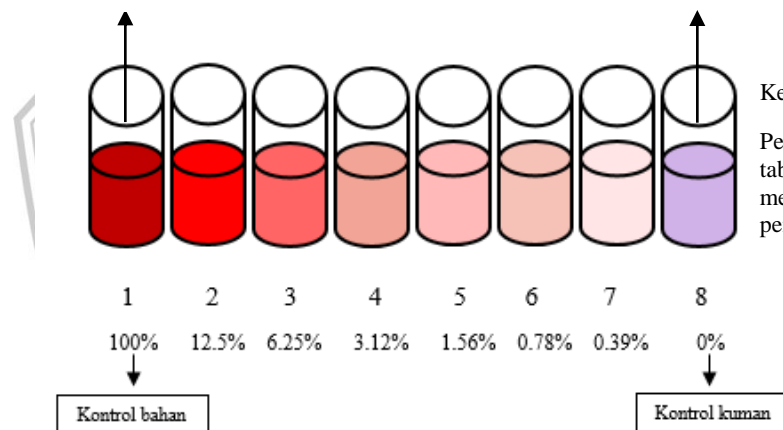
Keterangan:

Perubahan warna dari tabung 2 ke tabung 7 yang semakin memudar mengindikasikan telah dilakukan pengenceran

- i. Setelah itu tabung 2 sampai 7 ditambahkan perbenihan cair bakteri 0.5 ml.
- j. Dengan demikian, volume masing-masing tabung menjadi 1 ml, sehingga konsentrasi akhir antimikroba berubah seperti berikut ini :

Ekstrak kelopak bunga rosella

*Streptococcus pyogenes*



Keterangan:

Perubahan warna dari tabung 2 ke tabung 7 yang semakin memudar mengindikasikan telah dilakukan pengenceran

- k. Kemudian semua tabung diinkubasikan ke dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.

Hari ke-2

Pada hari ke-2 tabung dikeluarkan dari inkubator, kemudian dari masing-masing tabung diambil 1 ose dan diinokulasikan pada medium *Blood Agar Plate* (BAP). Setelah itu, diinkubasikan lagi 18-24 jam pada suhu 37 °C.

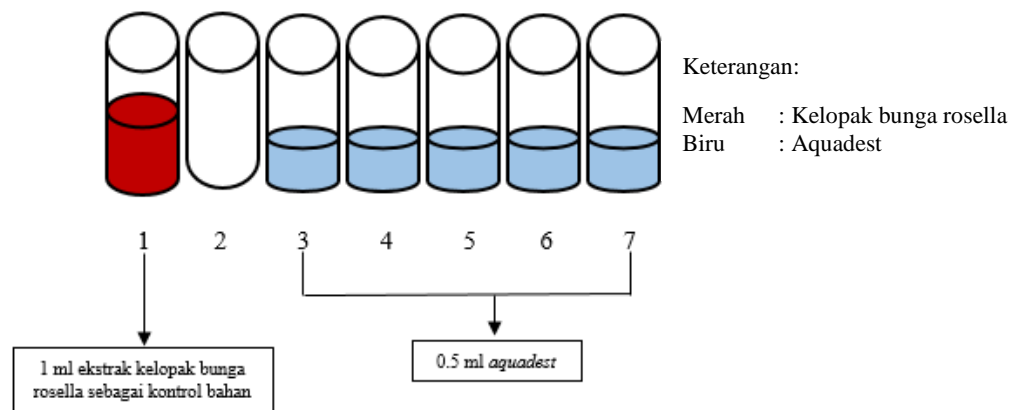
Hari ke-3

*Blood Agar Plate* (BAP) dikeluarkan dari inkubator kemudian dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter* sehingga didapatkan data Kadar Bunuh Minimal (KBM), yaitu kadar minimal yang diperlukan antimikroba untuk membunuh mikroba.

#### 4.7.6.2 Metode Difusi Cakram

Uji kepekaan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) terhadap *Streptococcus pyogenes* dengan metode difusi cakram berdasarkan penelitian (Miranti, et al., 2013), dapat digambarkan sebagai berikut:

- a. Untuk pembuatan konsentrasi awal siapkan tabung 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 tanpa tabung kontrol kuman.
- b. Masukkan 0.5 ml *aquadest* pada tabung 3, 4, 5, 6, dan 7.

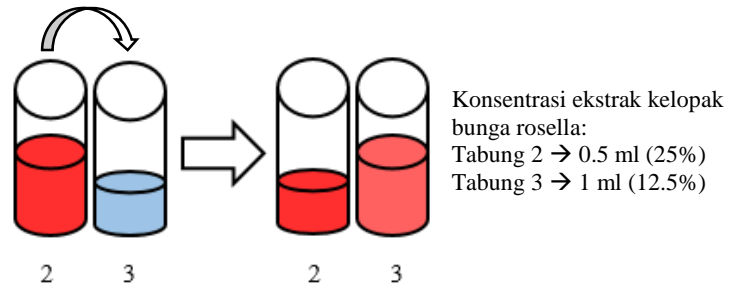


- c. Masukkan 0.5 ml (100%) ekstrak kelopak bunga rosella ke dalam *aquadest* 0.5 ml, campurkan merata dengan menggunakan vorteks (volume menjadi 1 ml, konsentrasi 50%), lalu ambil 0.5 ml (50%) ekstrak kelopak bunga rosella tersebut dan masukkan lagi ke dalam *aquadest* 0.5 ml, campurkan merata

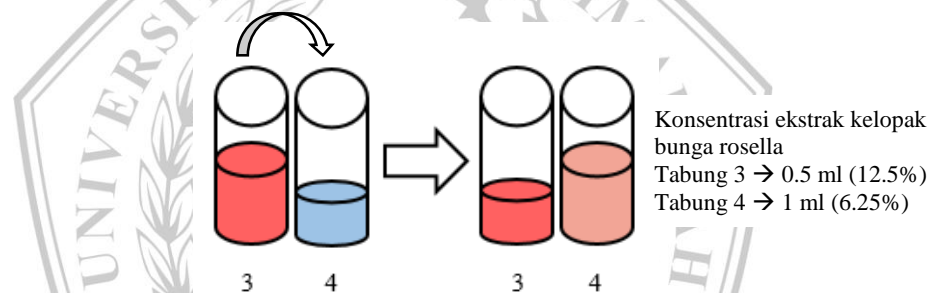
dengan menggunakan vorteks (volume menjadi 1 ml, konsentrasi 25%).

Masukkan volume 1 ml dengan konsentrasi 25% tersebut ke dalam tabung 2.

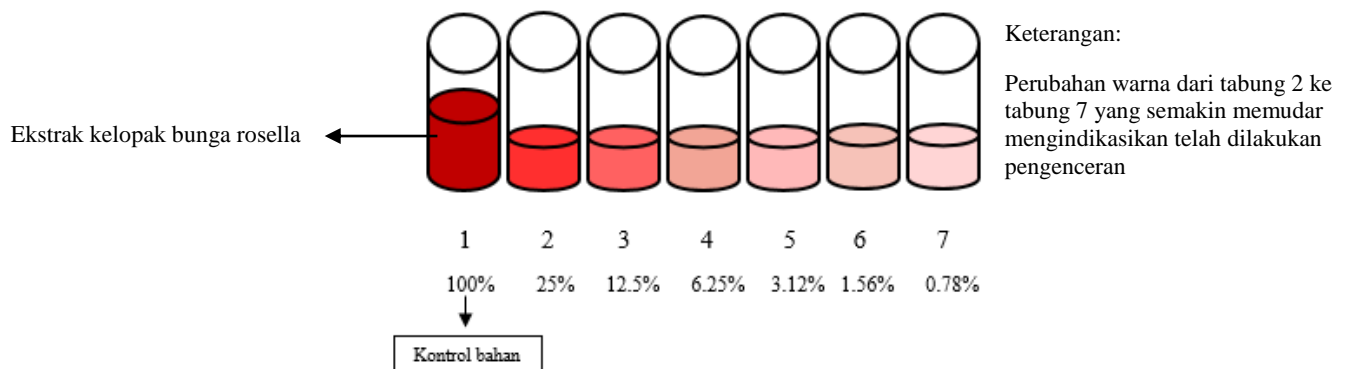
- d. Ambil 0.5 ml dari tabung 2 kemudian masukkan dalam tabung 3.



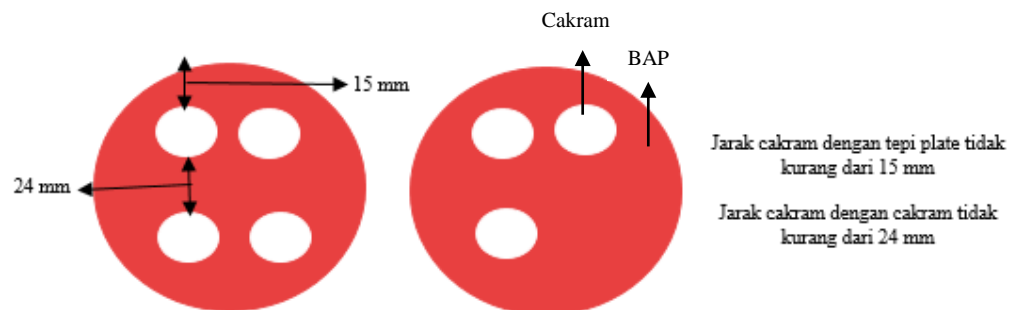
- e. Mencampur hingga rata *aquadest* dengan ekstrak kelopak bunga rosella pada tabung 3 kemudian pindahkan 0.5 ml ke dalam tabung 4.



- f. Melakukan hal yang sama terhadap tabung 5, 6, dan 7.  
 g. Pada tabung 7 setelah tercampur rata, larutan dibuang sebanyak 0.5 ml. Dari pengenceran diatas, maka volume tabung 2 sampai 7 menjadi 0.5 ml dengan konsentrasi ekstrak dari masing-masing tabung adalah:



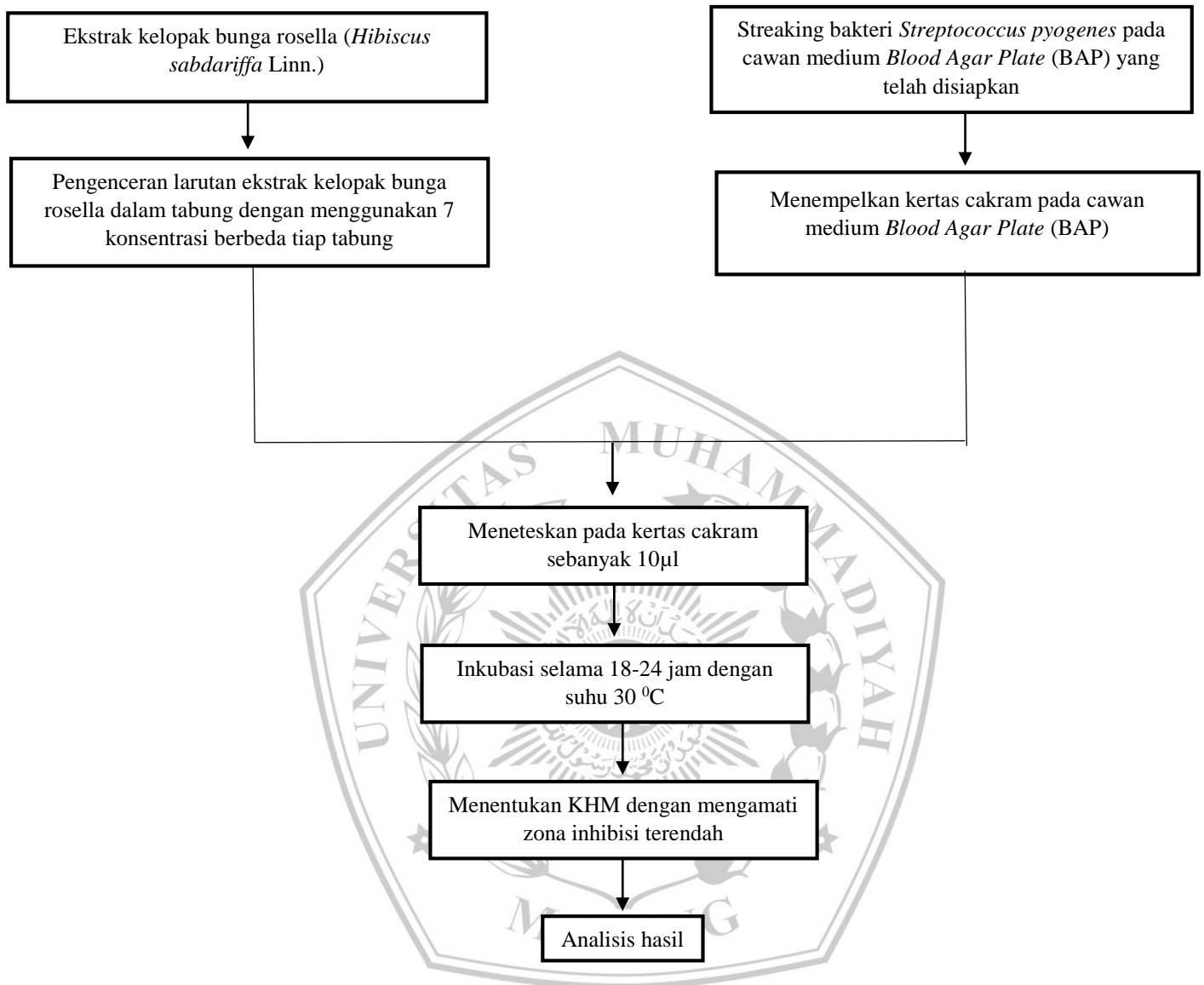
- h. Siapkan *Blood Agar Plate* (BAP) yang sudah di *streaking* bakteri *Streptococcus pyogenes*.
- i. Tempelkan 7 cakram pada cawan *Blood Agar Plate* (BAP), jarak cakram dengan tepi plate tidak kurang dari 15 mm dan jarak cakram dengan cakram lainnya tidak kurang 24 mm.
- j. Tetesi 7 cakram dengan masing-masing konsentrasi (100%; 25%; 12.5%; 6.25%; 3.12%; 1.56%; 0.78%) sebanyak 10  $\mu$ l.



- k. Diamkan 3 menit agar konsentrasi meresap kedalam cakram.
- l. Kemudian cawan diinkubasi ke dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 30 °C.
- m. Setelah diinkubasi, tentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak kelopak bunga rosella dengan melihat zona inhibisi terendah pada cakram dengan cara diameter dikurangi 6 mm.

#### 4.8 Diagram Alur Penelitian

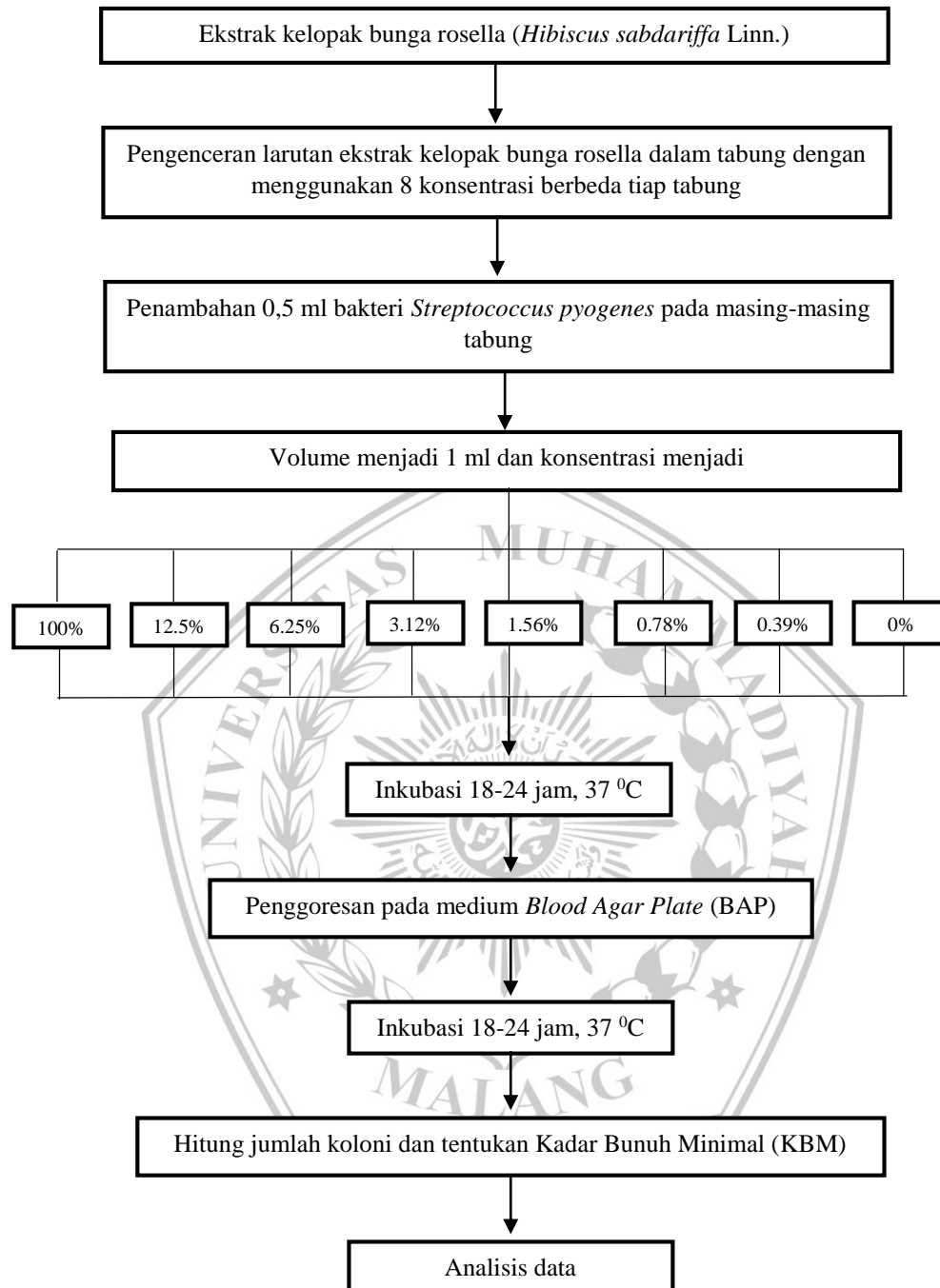
##### 4.8.1 Difusi Cakram (*Disk Method*)



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian Difusi Cakram



#### 4.8.2 Dilusi Tabung (*Tube Dilution Test*)



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian Dilusi Tabung

#### 4.9 Analisis Data

Pada penelitian ini, analisis yang digunakan dalam menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa* Linn.) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah sebagai berikut:

1. Langkah pertama dalam mengolah data adalah dengan uji normalitas data.

Pada penelitian ini dilakukan uji normalitas data menggunakan *Saphiro – Wilk* ( $n < 50$ ) untuk mengetahui apakah kelompok data penelitian terdistribusi normal atau tidak normal. Distribusi data normal jika  $p > 0.05$ . Hasil uji normalitas data pada penelitian ini menunjukkan bahwa data hasil penelitian terdistribusi normal karena nilai signifikansinya  $> 0.05$ .

2. Setelah data terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas data menggunakan *Levene's Test* untuk mengetahui apakah varian data penelitian sama atau homogen. Dikatakan varian data sama atau homogen jika  $p > 0,05$ . Uji homogenitas data pada penelitian ini menunjukkan varian data yang homogen karena nilai signifikansinya  $> 0.05$

3. Data yang telah terdistribusi normal dengan varian data yang sama atau homogen akan dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA* kemudian *Post Hoc Bonferroni*. Hasil data pada penelitian ini menunjukkan bahwa nilai signifikansi dari uji *one way ANOVA*  $< 0.05$ . Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella. Hasil uji *Post Hoc Bonferroni* menunjukkan bahwa nilai signifikansi  $< 0.05$  yang berarti pemberian ekstrak kelopak bunga

rosella memberikan pengaruh dalam menghambat dan membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes*.

4. Pada penelitian ini dilakukan uji regresi linier untuk melihat seberapa besar pengaruh perlakuan pada pertumbuhan bakteri. Dikatakan adanya pengaruh jika nilai signifikansi  $< 0,05$ . Uji regresi linier dilakukan dengan cara melihat  $R^2$  (*R Square*) pada output SPSS. Untuk memprediksi pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan bakteri menggunakan persamaan regresi linier sederhana yaitu  $Y = a + bX$ , dimana Y adalah variabel tergantung, X adalah variabel bebas, a adalah angka konstan dan b adalah angka koefisien regresi. Pada penelitian ini, nilai determinasi (*Adjusted R Square*) pada metode difusi cakram sebesar 0,799 yang berarti bahwa ekstrak kelopak bunga rosella memiliki pengaruh sebesar 79.9% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dan sisanya dipengaruhi oleh faktor-faktor lain yang akan dibahas pada bab pembahasan. Sedangkan nilai determinasi (*Adjusted R Square*) pada metode difusi tabung sebesar 0,523 yang berarti bahwa ekstrak kelopak bunga rosella memiliki pengaruh sebesar 52.3% dalam membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes* per cawan dan sisanya dipengaruhi oleh faktor-faktor lain yang akan dibahas pada bab pembahasan.